RIDASCREEN® Calprotectin

Réf. : G09036

R-Biopharm AG, An der neuen Bergstraße 17, D-64297 Darmstadt
Allemagne
Tél. : +49 (0) 61 51 81 02-0 / Fax : +49 (0) 61 51 81 02-20

1. Domaine d'application

Pour usage diagnostique *in vitro*. RIDASCREEN® Calprotectin est un kit de dosage immunoenzymatique destiné à la détection quantitative de la calprotectine humaine dans des échantillons de selles.

2. Résumé et explication du test

La calprotectine est une protéine se liant au calcium qui est, entre autre, composée de granulocytes neutrophiles et qui est libérée en cas d'inflammation.
La calprotectine présente dans les selles sert de biomarqueur pour les processus inflammatoires et les modifications néoplasiques des voies gastro-intestinales.

La calprotectine (également appelée MRP-8/14, calgranuline A/B ou S100A8/A9) est une protéine du groupe S100 qui se lie au calcium et au zinc.
Dans des conditions physiologiques, la calprotectine se lie au calcium ; cette liaison conditionne la haute stabilité en cas d'exposition à la chaleur et dans le cadre d'une protéolyse.
La calprotectine est composée de granulocytes neutrophiles et de monocytes. Dans le cytosol des neutrophiles, la calprotectine est présente à des concentrations comprises entre 5 et 15 mg/l et représente environ 60 % des protéines cytosoliques solubles et 5 % de la protéine complète.
La fonction biologique de la calprotectine reste en partie obscure. On suppose qu'elle agit sur la protection des cellules contre les protéases leucocytaires et bactériennes. En outre, sa propriété de liaison au zinc lui confère une action antimicrobienne. La calprotectine présente également des propriétés de régulation intra et extracellulaire lors du processus inflammatoire.

En cas de maladie inflammatoire de l'intestin, les granulocytes migrent dans les intestins et libèrent la calcprotectine qui est éliminée dans les selles. La concentration en calprotectine dans les selles dépend de la numération en granulocytes neutrophiles qui migrent dans les intestins et qui y libèrent la calprotectine. Ainsi, la concentration en calprotectine dans les selles permet de mesurer la numération en granulocytes dans les intestins et indique l'intensité d'un processus inflammatoire dans l'intestin.

La pertinence clinique particulière de la détection de la calprotectine dans les selles réside dans la possibilité de poser un diagnostic sûr d'inflammation dans le tractus intestinal. En termes de symptômes, il est très difficile de distinguer les patients souffrant d'une maladie inflammatoire chronique de l'intestin (MICI) de ceux qui présentent un syndrome du côlon irritable. La détermination de la concentration en calprotectine dans les selles offre dans ce cas une indication sûre de la présence d'une inflammation dans l'intestin. Grâce à ce biomarqueur, de nombreux patients souffrant du côlon irritable peuvent ainsi s'épargner une coloscopie inutile.

De nombreuses publications ont démontré que la détection de la calprotectine dans les selles correspondait très étroitement avec les résultats histologiques et endoscopiques de l'activité pathologique chez les patients MICI. C'est pourquoi la détection de la calprotectine dans les selles sert également à documenter de manière objective la réussite du traitement chez les patients souffrant d'inflammations chroniques, ainsi qu'à détecter et circonscrire précocement une récidive dans le cadre de la surveillance de ces patients pendant la période asymptomatique.

Détection de la calprotectine dans les selles

- Distinction sûre entre les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin et le syndrome du côlon irritable
- Détection précoce d'une activité inflammatoire dans le tractus intestinal
- Documentation objective de l'intensité de l'inflammation à des fins de suivi en cours de traitement
- Marqueur pour les inflammations aiguës de l'intestin

3. Principe du test

RIDASCREEN® Calprotectin met en œuvre des anticorps spécifiques utilisés dans une réaction antigène-anticorps de type sandwich. Des anticorps monoclonaux dirigés contre la calprotectine humaine se lient à la surface du puits de la plaque de microtitrage. Une suspension de l'échantillon de selles à analyser est pipetée et incubée dans le puits de la plaque de microtitrage. Une étape de lavage et une seconde incubation avec un anticorps monoclonal conjugué à de la peroxydase de raifort interviennent ensuite. En cas de présence de calprotectine, il se forme un complexe en sandwich composé de l'anticorps immobilisé, de la calprotectine et de l'anticorps conjugué. Les anticorps marqués à l'enzyme non liés sont éliminés lors d'une étape de lavage ultérieure. Après ajout du substrat, l'enzyme liée change la couleur de la solution présente dans les puits de la plaque de microtitration, qui passe d'incolore à bleue lorsque l'échantillon est positif. En ajoutant le réactif d'arrêt, la couleur passe du bleu au jaune. L'extinction mesurée est proportionnelle à la concentration en calprotectine présente dans l'échantillon.

4. Contenu de la trousse

Les réactifs d'une trousse permettent d' effectuer 96 déterminations.

Plate	96 déterminations	Plaque de microtitration ; 12 lames de microtitration (sécables) sur un support ; revêtues d'anticorps monoclonal (souris) dirigé contre la calprotectine humaine
Extract	2 x 100 ml	Tampon d'extraction (concentré x3) ; tampon tris ; contient du NaN3 à 0,05 %
Diluent | 3	100 ml	Tampon de diluant d'échantillon ; solution de NaCl tamponnée avec des protéines ; contient du NaN_3 à 0,1 % ; prêt à l'emploi ; de couleur rouge
Wash	100 ml	Tampon de lavage (concentré x10) ; solution de NaCl tamponnée avec du phosphate ; contient du thimerosal à 0,1 % et un détergent à 0,1 %
Calibrator *Couvercle transparent*	1 ml	Étalon (si un étalonnage à 1 point est utilisé); contient du NaN_3 à 0,1 % ; prêt à l'emploi ;
Standard 1 - Standard 5 *Couvercle blanc*	1 ml	5 étalons (si une courbe d'étalonnage est utilisée) ; Concentrations en calprotectine des étalons 1 à 5 : 19,5 / 56 / 95 / 275 / 800 mg/kg ; contiennent du NaN_3 à 0,1 % ; prêts à l'emploi
Control | + *Couvercle rouge*	1 ml	Contrôle positif ; contient du NaN_3 à 0,1 % ; prêt à l'emploi
Low control | + *Couvercle vert*	1 ml	Contrôle faiblement positif ; contient du NaN_3 à 0,1 % ; prêt à l'emploi
Conjugate	12 ml	Anticorps monoclonal (souris) conjugué à de la peroxydase dans une solution protéique stabilisante ; prêt à l'emploi
SeroSC	12 ml	Substrat ; peroxyde d'hydrogène / tétraméthylbenzidine (TMB) ; prêt à l'emploi
SeroStop	12 ml	Réaction d'arrêt ; acide sulfurique à 1 N ; prête à l'emploi

5. Conservation des réactifs

Tous les réactifs doivent être conservés entre 2 et 8 °C et peuvent être utilisés jusqu'à la date de péremption imprimée sur l'étiquette. Le tampon de lavage dilué est stable pendant 4 semaines lorsqu'il est conservé entre 2 et 8 °C. Le tampon d'extraction dilué est stable pendant 6 mois lorsqu'il est conservé entre 2 et 8 °C et au maximum jusqu'à la date de péremption du concentré. Éviter toute contamination microbienne. Une fois la date de péremption passée, la qualité n'est plus garantie. Le flacon en aluminium des lames de microtitrage doit être ouvert avec des ciseaux de manière à ne pas séparer la fermeture à clip. Les barrettes des puits de la plaque de microtitration inutilisées doivent être replacées immédiatement dans le flacon en aluminium fermé et conservées entre 2 et 8 °C. Tenir le substrat incolore à l'abri de la lumière directe du soleil pour prévenir toute désintégration ou tout bleuissement par auto-oxydation. En cas de bleuissement, le substrat ne peut plus être utilisé.

6. Réactifs supplémentaires nécessaires ; accessoires nécessaires

6.1. Réactifs

- Eau distillée ou désionisée

6.2. Accessoires

- Balance de précision ou flacon de coproculture RIDASCREEN® (réf. GZ3006)
- Malaxeur au vortex (en option, voir Rubrique 9.4)
- Micropipette pour volumes de 20 - 100 µl et 1 ml
- Éprouvette (1000 ml)
- Minuteur
- Appareil de lavage pour plaques de microtitration ou pipettes multicanaux (300 µl)
- Photomètre pour plaques de microtitration (450 nm ; filtre de référence 620 nm)
- Papier filtre (essuie-tout pour laboratoire)
- Récipient à déchets contenant une solution d'hypochlorite à 0,5 %

7. Précautions

Réservé au diagnostic *in vitro*.

Ce test doit être effectué uniquement par du personnel de laboratoire ayant reçu une formation adéquate. Les recommandations relatives au travail dans les laboratoires médicaux doivent être respectées. Les instructions concernant la réalisation du test doivent être rigoureusement suivies.

Les échantillons de selles doivent être considérés comme potentiellement infectieux et manipulés conformément à la réglementation nationale relative à la sécurité.

Ne pas pipeter les échantillons ou les réactifs à la bouche ; éviter tout contact avec une peau éraflée ou avec les muqueuses buccales. Porter des gants à usage unique pour manipuler les échantillons et se laver les mains après le test. Ne pas fumer, manger ni boire dans les zones où sont manipulés les échantillons ou les réactifs de test.

Le tampon de lavage contient du thimerosal à 0,1 % comme conservateur. Éviter tout contact avec la peau ou la muqueuse buccale.

L'étalon, le contrôle positif et le contrôle faiblement positif, ainsi que le tampon d'extraction et de diluant d'échantillon contiennent du NaN_3 à 0,05 % ou 0,1 % comme conservateur. Éviter tout contact avec la peau ou la muqueuse buccale.

Le peroxyde d'hydrogène (substrat) est corrosif. Le manipuler avec précaution !

Le réactif d'arrêt contient de l'acide sulfurique à 1 N. Éviter tout contact avec la peau et avec les vêtements ! En cas de contact cutané, rincer à l'eau.

L'ensemble des réactifs et matériaux entrant en contact avec des échantillons potentiellement infectieux doivent être manipulés avec des agents de désinfection adaptés ou passer en autoclave à 121 °C pendant au moins une heure. ATTENTION : Pour éviter la formation de gaz nocifs, les résidus de liquide contenant le réactif d'arrêt doivent être neutralisés avant d'être placés dans une solution d'hypochlorite.

8. Prélèvement et conservation des échantillons

Si possible, les échantillons de selles doivent être refroidis pendant le transport, et conservés entre 2 et 8 °C jusqu'au début du test. Si l'analyse n'est pas effectuée à réception (sous 3 jours), une conservation à -20 °C ou une température inférieure est recommandée. Si les échantillons de selles sont congelés, les granulocytes neutrophiles présents risquent de mourir et la calprotectine d'être libérée. C'est pourquoi, la concentration peut être légèrement plus élevée qu'avec des échantillons frais. Éviter les congélations et décongélations multiples des échantillons. Les échantillons de selles ne doivent pas être mélangés dans les récipients de transport contenant des milieux de transport renfermant des conservateurs, des sérums animaux, des ions métalliques, des agents oxydants ou des détergents car ceux-ci pourraient interférer avec RIDASCREEN® Calprotectin.

9. Réalisation du test

9.1. Généralités

Avant utilisation, porter impérativement tous les réactifs et la plaque de microtitration à température ambiante (20 - 25 °C). Sortir les barrettes de puits de la plaque de microtitration du

Kommentar [CF1]: die Übersetzerin war hier der Meinung, dass „Mirotiterplatte Plate“ übersetzt werden sollte. Bitte prüfen.

flacon en aluminium dès qu'elles sont à température ambiante. Les réactifs doivent être bien mélangés juste avant l'utilisation. Après utilisation, conserver les lames de microtitration (dans le flacon fermé) et les réactifs entre 2 et 8 °C. Les lames de microtitration ne doivent pas être réutilisées. Les réactifs et les lames de microtitration ne doivent pas être utilisés lorsque l'emballage est endommagé ou que le récipient n'est pas étanche. Éviter tout contact direct entre les échantillons et les composants de la trousse afin de prévenir une contamination croisée. Tenir à l'abri du rayonnement direct du soleil pendant l'exécution du test. Il est recommandé de recouvrir ou de sceller les plaques de microtitrage pour éviter les pertes par évaporation.

9.2.Préparation du tampon de lavage

Mélanger 1 volume du concentré de tampon de lavage Wash dans 9 volumes d'eau distillée (1:10). Pour cela, verser 100 ml de concentré dans une éprouvette 1000 ml et remplir avec de l'eau distillée jusqu'à 1000 ml. Les cristaux éventuellement présents dans le concentré doivent être préalablement dissous par réchauffement (bain d'eau à 37 °C).

9.3. Préparation du tampon d'extraction

Mélanger 1 volume de concentré de tampon d'extraction Extract (100 ml) dans 2 volumes d'eau distillée (200 ml) (1:3).

9.4. Préparation des échantillons

Dans la mesure du possible, maintenir les échantillons de selles entre 2 et 8 °C jusqu'à leur traitement. En cas de conservation prolongée (> 3 jours), les maintenir à -20 °C ou une température inférieure. Les échantillons congelés doivent être ramenés lentement à température ambiante.

9.4.1. Traitement et remise en suspension des échantillons par pesée

Peser 100 mg d'échantillon de selles dans un tube à essai, puis pipeter 5 ml du tampon d'extraction dilué (dilution selon un rapport 1:50).

Il est possible de peser entre 80 et 130 mg d'échantillon de selles et, pour garantir un rapport de dilution constant (1:50), les volumes de tampon d'extraction sont définis en fonction de l'échantillon de selles pesé (voir Tableau 1).

Tableau 1 : Quantité de tampon d'extraction dilué nécessaire en fonction du volume de selles pesé

Poids [mg]	Volume [ml]
80	4,00
85	4,25
90	4,50
95	4,75
100	5,00
105	5,25
110	5,50
115	5,75
120	6,00
125	6,25
130	6,50

Si des volumes de tampon d'extraction constants de 5 ml sont remis en suspension, le facteur de dilution variable doit être pris en compte lors de l'évaluation (voir Tableau 2).

Tableau 2 : Facteur de dilution lors de l'ajout constant au tampon d'extraction dilué (5 ml) en fonction de la quantité de selles pesée

Poids [mg]	Facteur de dilution [ml]
80	62,50
85	58,82
90	55,55
95	52,63
100	50,00
105	47,62
110	45,45
115	43,45
120	41,66
125	40,05
130	38,46

Quelle que soit la méthode de pesée, l'homogénéité de la suspension de selles est obtenue par mélange complet au vortex. Pour les selles liquides, pipeter précisément 100 µl et les mettre en suspension dans précisément 5 ml de tampon d'extraction dilué.

Après ajout du tampon d'extraction, les échantillons doivent être incubés pendant 5 minutes à température ambiante, puis remélangés complètement au vortex. Juste après, l'homogénéisat doit être centrifugé pendant 10 minutes à 3000 g au moins pour sédimenter les grosses particules de selles. Le surnageant de l'extrait doit être dilué puis utilisé directement pour le test.

a. Dilution manuelle des échantillons

Diluer 20 µl du surnageant décanté dans 980 µl de tampon de dilution d'échantillon RIDASCREEN® Diluent | 3 (1:50). Ensuite, utiliser 100 µl de l'échantillon de selles à sa dilution finale dans le cadre du test.

Le flacon de coproculture RIDASCREEN® (réf. GZ3006, voir rubrique 9.4.2.) peut servir d'alternative au traitement et à l'homogénéisation de l'échantillon décrits ci-dessus.

b. Dilution d'échantillon automatisée

Si le test est réalisé sur un appareil DSX-ELISA entièrement automatisé de la société Dynex, le protocole de mesure à appliquer sera mis à disposition et installé sur demande auprès de R-Biopharm AG. Comme indiqué ci-après, l'échantillon est ensuite dilué automatiquement par l'appareil.

L'appareil ELISA pipette 20 µl du surnageant décanté dans une plaque à puits profonds, puis les dilue dans 980 µl de tampon d'extraction dilué (1:50). Cette opération est suivie de deux cycles de mélange.
Positionner le nombre requis de puits sur le support de la plaque de microtitration RIDASCREEN® Calprotectin. Transférer 100 µl de la dilution d'échantillon de la plaque à puits profonds vers la plaque de microtitration RIDASCREEN® Calprotectin (dilution finale 1:2500).

Si le test est réalisé sur un autre automate de pipetage ELISA, contacter R-Biopharm AG.

9.4.2. Préparation et mise en suspension de l'échantillon dans le flacon de coproculture RIDASCREEN® (réf. GZ3006)

Le flacon de coproculture RIDASCREEN® (réf. GZ3006) est une alternative rapide et simple à la préparation et la mise en suspension des échantillons par pesée des selles décrites à la rubrique 9.4.1. Proposé en tant qu'accessoire du RIDASCREEN® Calprotectin, il simplifie considérablement la préparation de l'échantillon.

Le flacon de coproculture RIDASCREEN® prérempli de 2,5 ml de tampon d'extraction prêt à l'emploi peut contenir 10 mg d'échantillon de selles. Si les selles sont liquides, 10 µl d'échantillon peuvent être mesurés à l'aide de la pipette, puis pipetés directement dans le tampon d'extraction.

Le prélèvement et l'extraction de l'échantillon sont décrits et illustrés précisément dans le mode d'emploi joint au flacon de coproculture RIDASCREEN® ; il peut également être téléchargé sur le site www.r-biopharm.de.

Les extraits de selles ne doivent pas être conservés, mais être utilisés immédiatement après dilution dans le cadre du test.

a. Dilution manuelle des échantillons

Diluer 100 µl de la suspension de selles obtenue avec le flacon de coproculture RIDASCREEN® (réf. GZ3006), décrit dans la rubrique 8 du mode d'emploi du GZ3006, dans 900 µl de tampon de dilution d'échantillon RIDASCREEN® Diluent|3. Utiliser 100 µl de l'échantillon de selles à sa dilution finale directement dans le cadre du test.

b. Dilution d'échantillon automatisée

Si le test est réalisé sur un appareil DSX-ELISA entièrement automatisé de la société Dynex, le protocole de mesure à appliquer sera mis à disposition et installé sur demande auprès de R-Biopharm AG.

Positionner le nombre requis de puits sur le support de la plaque de microtitrationRIDASCREEN® Calprotectin. La suspension de selles extraite avec le flacon de coproculture est diluée automatiquement selon un rapport 1:10 (dilution finale 1:2500) sur les plaques de microtitration de l'automate ELISA. Pour ce faire, 10 µl de la suspension de selles sont pipetés directement du flacon de coproculture RIDASCREEN® (réf. GZ3006) dans la plaque de microtitration Calprotectin, puis dilués dans90 µl de diluant 3 Diluent | 3.

Si le test est réalisé sur un autre automate de pipetage ELISA, contacter R-Biopharm AG.

9.5 Première incubation

Après avoir placé un nombre suffisant de puits dans le support, ajouter 100 µl d'étalon Calibrator (si un étalonnage à 1 point est utilisé ; recommandé dans le cadre d'une double détermination) **ou** 100 µl d'étalon 1 à étalon 5 Standard 1 – Standard 5 (si une courbe d'étalonnage est utilisée ; recommandé dans le cadre d'une double détection), puis 100 µl de tampon de dilution d'échantillon RIDASCREEN® Diluent | 3 (=contrôle négatif), de contrôle positif Control | + et de dilution d'échantillon de selles à analyser dans chaque puits. Si le contrôle faiblement positif Low control | + est utilisé, en transférer 100 µl dans le cadre du test. Enfin, incuber la plaque pendant une heure à température ambiante (20 - 25 °C).

9.6. Première étape de lavage

Il est important de procéder à un lavage minutieux pour obtenir des résultats corrects ; il convient donc de respecter rigoureusement les instructions. L'incubat présent dans les puits doit ensuite être vidé dans un récipient à déchet contenant une solution d'hypochlorite à des fins de désinfection. Puis, placer la plaque sur le papier absorbant pour éliminer l'humidité résiduelle. Enfin, laver 5 fois avec un tampon de lavage dilué de 300 µl (voir Rubrique 9.2.).

Après chaque lavage, veiller à vider complètement les puits en les posant sur un endroit encore sec et inutilisé du papier.

Si un automate de lavage est utilisé, veiller à bien le régler en fonction du type de plaque de microtitration utilisée. En outre, centrifuger une suspension de selles présentant des particules pour les éliminer manuellement du puits et éviter d'obstruer les aiguilles de lavage.

Lors des étapes de lavage, veiller à aspirer tout le liquide. Après la dernière étape de lavage, la plaque doit être entièrement recouverte d'un papier absorbant propre ou d'un essuie-tout pour laboratoire pour éliminer l'humidité résiduelle.

9.7. Deuxième incubation

Ajouter 100 µl de conjugué Conjugate dans tous les puits. Enfin, incuber la plaque pendant une heure à température ambiante (20 - 25 °C).

9.8. Deuxième étape de lavage

Suite à l'incubation, le conjugué présent dans les puits doit être vidé dans un récipient à déchet contenant une solution d'hypochlorite à des fins de désinfection. Puis, placer la plaque sur le papier absorbant pour éliminer l'humidité résiduelle. Enfin, laver 5 fois avec 300 µl de tampon de lavage dilué. Après chaque lavage, veiller à vider complètement les puits en les posant sur un endroit encore sec et inutilisé du papier.

9.9. Troisième incubation

Ajouter 100 µl de substrat SeroSC dans tous les puits. Enfin, incuber la plaque pendant 15 minutes dans le noir, à température ambiante (20 - 25 °C). Par ailleurs, la réaction est arrêtée en ajoutant 50 µl de réactif d'arrêt SeroStop dans tous les puits.

Suite au mélange soigneux (tapotement léger sur le support), l'extinction est mesurée à 450 nm, avec une longueur d'onde de référence de 620 nm.

Remarque : lorsque les échantillons de patients sont très positifs, le substrat peut former un précipité noirâtre. Ces échantillons doivent être dilués selon un rapport 1:10, puis de nouveau testés (voir la Rubrique 9.5.) (dilution finale de l'échantillon de selles : 1:25000).

10. Contrôle qualité - signes de dégradation du réactif

À des fins de contrôle qualité, transférer impérativement et à chaque test l'étalon Calibrator (si un étalonnage à 1 point est utilisé ; recommandé pour la détermination double) **ou** les étalons 1 à 5 Standard 1 – Standard 5 (si une courbe d'étalonnage est utilisée ; recommandé dans le cadre d'une double détermination), le tampon de dilution d'échantillon RIDASCREEN® Diluent | 3 en guise de contrôle négatif et le contrôle positif Control | + pour garantir la stabilité du réactif et l'exécution correcte du test. L'utilisation du contrôle faiblement positif est facultative.

Le test se déroule correctement lorsque la valeur d'extinction (DO) du contrôle négatif à 450 nm / 620 nm est inférieure à 0,05 et que la valeur d'extinction (DO) moyenne de l'étalon (en cas d'évaluation par étalonnage à 1 point) se situe dans la plage indiquée sur la fiche technique spécifique à chaque lot de fabrication. Le contrôle positif permet de déterminer la validité du test, que l'on utilise l'étalon ou les cinq étalons ; il doit se situer dans la plage de concentrations spécifique à chaque lot de fabrication indiquée sur la fiche technique.

Lorsque le test RIDASCREEN® Calprotectin est effectué sur un appareil ELISA entièrement automatisé ouvert, selon l'automate, la valeur DO mesurée de l'étalon Calibrator (lorsque l'évaluation est réalisée par étalonnage à 1 point) peut être hors plage indiquée sur le certificat spécifique à chaque lot de fabrication. Sur les appareils ELISA entièrement automatisés également, seul le contrôle positif Control | + est important pour déterminer la validité des résultats de test ; il doit donc toujours être intégré. L'utilisation du contrôle faiblement positif Low control | + n'est pas indispensable.

Un écart par rapport aux valeurs fournies et un assombrissement du réactif ou un bleuissement du substrat incolore avant l'ajout dans le puits peuvent être des signes de dégradation du réactif. Si les valeurs prédéfinies ne concordent pas, vérifier les éléments suivants avant de recommencer le test :

- Stabilité des réactifs utilisés
- Capacité de fonctionnement de l'appareil utilisé (par ex. étalonnage)
- Exécution correcte du test
- Contrôle visuel des composants de la trousse à la recherche de contamination et d'absence d'étanchéité ; une solution de substrat bleutée ne doit plus être utilisée.

Si les conditions ne sont toujours pas remplies après répétition du test, contacter le fabricant ou le distributeur R-Biopharm local.

11. Évaluation et interprétation

La concentration en calprotectine (en mg/kg de selles) est déterminée dans le cadre du test ELISA RIDASCREEN® Calprotectin, soit par étalonnage à 1 point (voir Rubrique 11.1.), soit selon le modèle de régression logistique à 4 paramètres (4PL), soit à l'aide d'une courbe d'étalonnage (voir Rubrique 11.2.).

Le logiciel d'évaluation RIDA®SOFT Win.net est nécessaire pour calculer les résultats. Le logiciel RIDA®SOFT Win.net ou l'une de ses mises à jour peuvent être obtenus sur simple demande auprès de R-Biopharm AG ou du distributeur R-Biopharm local.

Si l'opérateur ne souhaite pas utiliser le logiciel RIDA®SOFT Win.net, il peut utiliser d'autres logiciels d'évaluation comportant le modèle de régression logistique à 4 paramètres.

11.1 Étalonnage à un point avec quantification selon le modèle de régression logistique à 4 paramètres

Les paramètres nécessaires au calcul 4PL (A - D) de la courbe d'étalonnage, ainsi que la valeur théorique pour l'étalon, le contrôle positif et le contrôle faiblement positif, sont indiqués sur la fiche technique spécifique à chaque lot de fabrication jointe à la trousse de test ; ils doivent être comparés aux valeurs indiquées dans le logiciel d'évaluation avant chaque mesure.

Dans les contrôles qualité finaux, R-Biopharm AG détermine la courbe d'étalonnage dans des conditions de test optimales pour chaque charge de la trousse (y compris les paramètres A - D), ainsi qu'une valeur théorique et une plage DO autorisée pour l'étalon ou une plage de concentrations autorisée pour le contrôle positif et le contrôle faiblement positif. L'étalon est intégré afin de comparer les fluctuations et de contrôler la qualité du test. Le contrôle positif fournit des informations sur la validité du test.

Le logiciel RIDA®SOFT Win.net calcule un facteur de correction F à partir de la valeur moyenne de la double détermination de l'étalon et de sa valeur théorique, ce qui lui permet de déduire les extinctions des échantillons de selles. Une évaluation sûre et fiable des résultats de test peut être établie dans les limites de la courbe d'étalonnage.

11.2. Quantification à l'aide de la courbe d'étalonnage

Le test RIDASCREEN® Calprotectin peut être évalué par le biais d'une courbe d'étalonnage, qui doit être intégrée dans chaque analyse. L'exemple de tracé de courbe d'étalonnage peut être réalisé à partir de la fiche technique spécifique aux charges.

Dans les contrôles qualité finaux, R-Biopharm AG détermine une valeur théorique et une plage de concentrations autorisée pour le contrôle positif et le contrôle faiblement positif dans des conditions de test optimale pour chaque charge de la trousse. Lorsque la quantification est réalisée à l'aide de la courbe d'étalonnage, le contrôle positif fournit des informations sur la validité du test. La plage de concentration prédéfinie du contrôle positif doit être atteinte.

11.3. Résultat du test

À partir d'une valeur seuil > 50 mg/kg de calprotectine humaine dans les selles, le résultat est considéré comme positif. Si les résultats sont inférieurs à la valeur seuil, les échantillons sont considérés comme négatifs.
La valeur seuil proposée pour les adultes, à savoir 50 mg/kg, peut également être appliquée aux enfants de 4 à 17 ans.

Nous recommandons à chaque laboratoire d'établir sa propre plage de valeurs.

Il est recommandé de diluer (rapport 1:5 dans Diluent 3) les échantillons présentant une concentration en calprotectine supérieure à 600 mg/kg dans le cadre de l'étalonnage à 1 point ou sur la courbe d'étalonnage et de les retester.

En outre, nous recommandons de diluer (rapport 1:5 dans Diluent 3) les échantillons présentant une valeur DO supérieure à 3,0 dans le cadre de l'évaluation par étalonnage à 1 point et de les retester.

12. Limites de la méthode

Le test RIDASCREEN® Calprotectin permet de dépister les épitopes de la calprotectine humaine dans les selles. Le diagnostic ne doit pas reposer exclusivement sur la détermination des concentrations en calprotectine et il doit tenir compte de l'anamnèse du patient.

13. Caractéristiques de performance

13.1. Précision

13.1.1. Précision intra-analyse

La précision intra-analyse a été déterminée dans le cadre d'une analyse menée avec 4 références testées en 40 répétitions chacune. Les valeurs DO de ces mesures ont permis de déterminer les concentrations en calprotectine à l'aide de l'étalon ou la courbe d'étalonnage et de calculer la valeur moyenne (VM), l'écart type (ET) et le coefficient de variation (CV) des mesures pour chaque échantillon.

Tableau 3: Précision intra-analyse du test RIDASCREEN® Calprotectin

	Étalon			Courbe d'étalonnage		
	VM (mg/kg)	ET (mg/kg)	**CV (%)**	VM (mg/kg)	ET (mg/kg)	**CV (%)**
Référence A	53,8	2,9	**5,4**	56,6	3,0	**5,3**
Référence B	96,6	5,5	**5,7**	102,4	6,3	**6,2**
Référence C	136,5	5,6	**4,1**	130,5	5,2	**4,0**
Référence D	246,7	14,1	**5,7**	267,6	15,0	**5,6**

13.1.2. Précision inter-analyse

La précision inter-analyse a été déterminée par 3 techniciens qui ont testé 4 références en double, dans le cadre de 20 analyses (2 par jour) menées sur plusieurs jours. Les valeurs DO de ces mesures ont permis de déterminer les concentrations en calprotectine, à l'aide l'étalon ou la courbe d'étalonnage et de calculer la valeur moyenne (VM), l'écart type (ET) et le coefficient de variation (CV) des mesures pour chaque échantillon.

Tableau 4: Précision inter-analyse du test RIDASCREEN® Calprotectin

	Étalon			Courbe d'étalonnage		
	VM (mg/kg)	ET (mg/kg)	**CV (%)**	VM (mg/kg)	ET (mg/kg)	**CV (%)**
Référence A	55,7	4,3	**7,7**	57,5	4,1	**7,1**
Référence B	106,5	7,2	**6,8**	112,8	8,3	**7,3**
Référence C	129,6	7,8	**6,0**	138,5	7,6	**5,5**
Référence D	260,9	28,3	**10,9**	284,7	22,7	**8,0**

13.2. Précision de l'extraction

La précision de l'extraction a été déterminée par 2 techniciens qui ont testé en double 3 échantillons de selles se trouvant au-delà du seuil, dans le cadre de 10 analyses
(5 jours, 2 cycles par jour), sur plusieurs jours. Les échantillons ont été extraits avant chaque analyse et dilués en conséquence. Les valeurs DO de ces mesures ont permis de déterminer les concentrations en calprotectine, à l'aide l'étalon ou la courbe d'étalonnage et de calculer la valeur moyenne (VM), l'écart type (ET) et le coefficient de variation (CV) des mesures pour chaque échantillon.

Tableau 5: Précision de l'extraction inter-analyse

	Étalon			Courbe d'étalonnage		
	VM (mg/kg)	ET (mg/kg)	**CV (%)**	VM (mg/kg)	ET (mg/kg)	**CV (%)**
Échantillon A	64,0	5,0	**7,9**	67,4	5,0	**7,5**
Échantillon B	114,1	10,3	**9,0**	123,2	10,7	**8,7**
Échantillon C	264,0	33,3	**12,6**	284,8	22,1	**7,8**

14. Bibliographie

Johne B et al. Functional and clinical aspects of the myelomonocyte protein calprotectin. J Clin Pathol Mol Pathol 1997; 50: 113-123.

Fagerhol MK. Calprotectin, a faecal marker of organic gastrointestinal abnormality. Lancet 2000; 268: 353-363.

Tibble JA et al. Surrogate markers of intestinal inflammation are predictive of relapse in patients with inflammatory bowel disease. Gastroenterology 2000; 119: 15-22.

Tibble J et al. A simple method for assessing intestinal inflammation in Crohn´s disease. Gut 2000; 47: 506-513.

Summerton CB et al. Faecal calprotectin: a marker of inflammation throughout the intestinal tract. Eur J Gastroenterol Hepatol 2002; 841: 841-845.

Striz I, Trebichavski I. Calprotectin – a pleiotropic molecular in acute and chronic inflammation. Physiol Res 2004; 53: 245-253.

Costa F et al. Calprotectin is a stronger predictive marker of relapse in ulcerative colitis than in Crohns disease. Gut 2005; 54: 364–368.

Fagerberg UL et al. Colorectal inflammation is well predicted by fecal calprotectin in children with gastrointestinal symptoms. J Pediatr Gastroenterol Nutr 2005; 40: 450-455.

Konikoff MR, Denson LA. Role of fecal calprotectin as a biomarker of intestinal inflammation in IBD. Inflamm Bowel Dis 2006; 12(6): 524-534.

Schopfer AM et al. Fecal calprotectin correlates more closely with the simple endoscopic score for Crohn' s disease (SES-CD) than CRP, blood leukocytes, and the CDAI.
Am J Gastroenterol 2010; 105: 162–169.

Van Rheenen PF et al. Faecal calprotectin for screening of patients with suspected inflammatory bowel disease: diagnostic meta-analysis. BMJ 2010; 341:c3369.